

Внелабораторный экспрессный газохроматографический способ анализа выдыхаемого человеком воздуха с автоматизированной градуировкой

А.О. Малышева^{1, 3}, М.Н. Балдин¹, *В.М. Грузнов^{1, 2, 3}, Л.В. Блинова¹

¹Институт нефтегазовой геологии и геофизики им. А.А. Трофимука Сибирского отделения
Российской академии наук, Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, пр-т Академика Коптюга, 3

²Новосибирский государственный университет,

Российская Федерация, 630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

³Новосибирский государственный технический университет,

Российская Федерация, 630073, г. Новосибирск, пр-т К. Маркса, 20

*Адрес для переписки: Грузнов Владимир Матвеевич, E-mail: Gruznovvm@ipgg.sbras.ru

Поступила в редакцию 19 февраля 2018 г., после доработки – 7 мая 2018 г.

В настоящее время актуальной задачей медицины, в частности профилактической, является разработка неинвазивных (бескровных) методик диагностики и определения риска различных заболеваний. Уделяется большое внимание возможностям анализа выдыхаемого воздуха для диагностики различных заболеваний – раковых, гастроэнтерологических, сахарного диабета и других. Возможности такого анализа определены широким набором выдыхаемых человеком летучих органических соединений. Возрастающий интерес к разработке неинвазивных методик диагностики заболеваний по анализу выдыхаемого человеком воздуха инициирует создание простых в обращении и портативных газовых анализаторов для массового обследования пациентов во внелабораторных условиях. Основные требования к газоанализаторам – это сочетание портативности, быстродействия, чувствительности и контроля стабильности отклика. В статье изложен удовлетворяющий этим требованиям газохроматографический метод экспрессного анализа выдыхаемого воздуха с автоматизированной градуировкой паровым источником концентрации. Использована портативная поликапиллярная газовая хроматография, обеспечивающая низкие пороги определения веществ при времени анализа в несколько десятков секунд. Обсуждается методика получения паровозной градуировочной концентрации паров ацетона на уровне 10^{-10} г/см³. Блок градуировки встроен в газовый хроматограф (ГХ), его программное управление обеспечивает автоматизацию градуировки ГХ. Оригинальная схема пробоотборного устройства (ПУ) обеспечивает многократный ввод пробы из разового выдоха человека и полностью аналогичный ввод градуировочной воздушной смеси в ГХ для уменьшения погрешностей градуировки. Структура программного обеспечения (ПО) реализована в терминах, удобных для практики химика-аналитика. Оригинальное ПУ, поликапиллярная газовая хроматография, встроенная автоматизированная градуировка обеспечивают анализ выдыхаемого воздуха в режиме реального времени в присутствии пациента. Проиллюстрирована возможность дифференцирования пациентов по нарушению метаболизма (обмену веществ) в организме человека по экспрессному анализу выдыхаемого воздуха предложенным газохроматографическим методом с автоматизированной градуировкой.

Ключевые слова: отбор выдыхаемого воздуха, экспрессный анализ выдыхаемого воздуха, поликапиллярная газовая хроматография, автоматизированная градуировка, паровозный источник концентрации.

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 2, pp. 177-185

DOI: 10.15826/analitika.2018.22.2.007

Non-laboratory express gas-chromatographic method of human breath analysis with automated graduation

A.O. Malysheva^{1, 3}, M.N. Baldin¹, *V.M. Gruznov^{1, 2, 3}, L.V. Blinova¹

¹Trofimuk Institute of Petroleum Geology and Geophysics of Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
Koptug Avenue, 3, Novosibirsk, 630090, Russian Federation

²*Novosibirsk State University, Pirogova St., 2, Novosibirsk, 630090, Russian Federation*³*Novosibirsk State Technical University, K. Marx Avenue, 20, Novosibirsk, 630073, Russian Federation***Corresponding author: Vladimir M. Gruznov, E-mail: Gruznovvm@ipgg.sbras.ru*

Submitted 19 February 2018, received in revised form 07 May 2018

One of the current urgent task in medicine, and preventive medicine in particular, is the development of noninvasive (without surgery) methods of diagnosis and determination of the risks of various diseases. Much attention is paid to the possibilities of exhaled breath analysis for the diagnosis of various diseases such as cancer, gastroenterology, diabetes and others. Possibilities of such analysis are determined by a wide range of human exhaled volatile organic compounds. The growing interest in the development of noninvasive methods of diagnosis of diseases by the analysis of exhaled breath initiated the creation of easy-to-use and portable gas analyzers for the mass examination of patients in non-laboratory conditions. The main requirements for such gas analyzers are combinations of portability, speed, sensitivity and stability control. Current article presents a gas chromatographic method of rapid analysis of exhaled breath with an automated calibration of the vapor-phase concentration source that meets all of the above requirements. A portable polycapillary gas chromatography is used, which provides low thresholds for the determination of substances at the time of analysis of a few tens of seconds. The method of obtaining the vapor-phase calibration concentration of acetone vapors at the level of 10^{-10} g/cm³ is discussed. The calibration unit is integrated into the gas chromatograph (GC), and its software control ensures the automation of GC calibration. The original scheme of the sampling system (SS) provides multiple input samples from a single exhalation of a person and a completely similar input calibration air mixture in GC to reduce the calibration errors. The structure of the software is implemented in convenient terms for the chemist-analyst practice. Original SS, polycapillary gas chromatography, and built-in automated calibration provide real-time analysis of exhaled air in the presence of the patient. The possibility of differentiation of patients by metabolic disorders (metabolism) in the human body by express analysis of exhaled air using the proposed gas chromatographic method of express analysis of exhaled air with automated calibration is illustrated.

Key words: automated sample device, express analysis of exhaled air, polycapillary gas chromatography, automated graduation, a head-space source of concentration.

ВВЕДЕНИЕ

Существующие методы диагностики состояния здоровья человека в недостаточной мере используют пробу выдыхаемого воздуха, очень простую для отбора. Вместе с тем, анализ выдыхаемого воздуха является хорошей альтернативой ряду первичных анализов, требующих отбора крови. В этом направлении ведутся исследования возможности диагностики рака легких по выдыхаемому воздуху с использованием масс-спектрометрии по таким метаболитам, как изопрен, ацетон, ацетонитрил, 1,3-циклогексан, 2-бутанон, 2,3-бутадиен [1]; рака желудка по ацетону, дисульфиду карбона, 2-пропанолу, этиловому спирту и др. [2]. Разрабатываются методы диагностики сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, по *n*-пентану [3], органов дыхания по определению 2,3-дигидро-1-инден-1-она, этил-цитрата, деканола-1, 2-феноксизанола и других среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха [4, 5]. В [6] приведено около двадцати диагностически значимых соединений, определяемых в пробе выдыхаемого воздуха при тех или иных нарушениях здоровья. В числе перспективных веществ: оксид азота NO, пентан, ацетон, изопрен, бензол [7, 8].

Ацетон в организме человека образуется при окислении свободных жирных кислот и попадает сначала в кровоток, затем в легкие и далее выдыхается человеком с характерной для взрослого человека концентрацией 0.5-1 ppm [9] (для ацетона 1 ppm = 2.54 мг/м³). Анализ выдыхаемого воз-

духа на наличие ацетона перспективен для диагностики сахарного диабета, контроля лечебного голодания и оценки эффективности физической нагрузки [10, 11]. Простота и безболезненность отбора проб выдыхаемого воздуха являются решающими преимуществами при выборе анализа выдыхаемого воздуха в качестве метода первичной диагностики нарушений метаболизма (обмена веществ) у взрослых и особенно у детей, в том числе младенческого возраста. Нужно отметить, что, несмотря на распространенный метод определения повышенной концентрации кетоновых тел (продуктов обмена веществ) в организме по анализу мочи с использованием тест-полосок, ацетон в выдыхаемом воздухе более активно отражает процессы в организме, чем ацетон в моче [11]. Преимущество анализа выдыхаемого воздуха во многом зависит от используемого аналитического оборудования, но решающими факторами являются простота и неинвазивность отбора пробы.

Для анализа выдыхаемого воздуха создан и разрабатывается ряд аналитических средств. Например, компактный прибор Ketonix [12] с порогом определения ацетона 1 ppm, временем анализа пробы порядка одной минуты. Но прибор не селективен, так как чувствителен также к спирту. Ведутся исследования возможностей компактных сенсоров на основе наноструктур [13], в том числе на основе наноструктурированной пленки с насаженным Si:WO₃, порог определения устройства по ацетону на уровне 20 ppb [14]. Выпускается портативный

лазерный анализатор LaserBreath-001 с временем определения концентрации ацетона в выдыхаемом воздухе 2 минуты, пределом определения ацетона 50 ppb [15]. Для этих целей исследуют также применение газовой хроматографии, масс- и хромато-масс-спектрометрии [5, 9]; полупроводниковых газовых сенсоров [16]. Отметим, что в имеющихся аналитических приборах в настоящее время не сочетаются актуальные качества для внелабораторных массовых обследований пациентов, а именно: портативность, быстроедействие, чувствительность и стабильность отклика.

Преимуществом специализированного портативного варианта поликапиллярной газовой хроматографии, используемой в настоящей работе, является высокая пороговая чувствительность, малое время анализа одной пробы (меньше 1 минуты) и возможность экспрессной градуировки с использованием парофазной градуировочной концентрации паров ацетона на уровне 10^{-10} г/см³.

Целью работы является разработка экспрессного высокочувствительного портативного газохроматографического способа анализа выдыхаемого воздуха с автоматизированной градуировкой для применения данного способа в различных исследованиях возможности ранней диагностики заболеваний, в том числе сахарным диабетом. Планировалось реализовать сочетание портативности с быстрымдействием, чувствительностью и оперативной градуировкой (контролем отклика). В результате создан портативный газохроматографический комплекс на основе поликапиллярного хроматографа серии ЭХО [17] с дополнением его оригинальным устройством подготовки выдыхаемого воздуха – пробоотборным устройством (ПУ) [18] и блоком градуировки. Для автоматизации анализа создано специальное программное обеспечение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Портативный комплекс. Использовали портативный газовый хроматограф (ГХ) «ЭХО-В-ФИД» (аналог ЭХО-EW [17]) с поликапиллярной колонкой (ПКК) и очищенным атмосферным воздухом в качестве газа-носителя, фотоионизационным детектором (ФИД) с энергией ионизации 10.6 эВ. Воздух очищается встроенным в ГХ миниатюрным фильтром. ПКК: длина 220 мм, 980 капилляров внутренним диаметром 40 мкм каждый с неподвижной жидкой фазой (НЖФ) OV-215, с толщиной плёнки 0.6 мкм. Порог определения углеводородов на уровне 1 ppb.

ГХ «ЭХО-В-ФИД» содержит автодозировочный ввод пробы из ПУ в ПКК встроенным насосом [19]. Объем пробы, вводимой в колонку автодозировочным вводом, задаётся оператором в пределах от 60 до 1400 мкл. Ввод пробы из ПУ производится в автоматическом режиме по заданной оператором программе из серии циклов анализа с заданными числом циклов в серии и периодом времени меж-

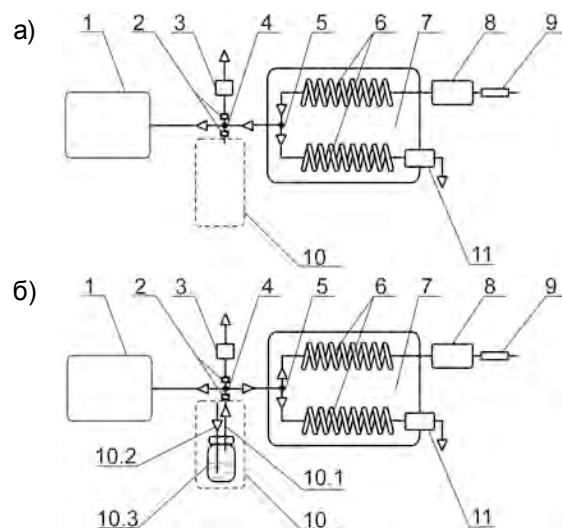


Рис. 1. Схема работы пробоотборного устройства в режиме отбора и анализа выдыхаемого воздуха (а): 1 – газовый хроматограф; 2 – клапаны переключения потоков выдыхаемого воздуха и градуировочной пробы; 3 – компрессор очистки ПУ; 4, 5 – четырёх- и трёхпортовый газовые коннекторы, соответственно; 6 – спиральные фторопластовые трубки; 7 – термостат; 8 – патрубок; 9 – мундштук; 10 – блок градуировки; 11 – датчик объема выдыхаемого воздуха. Схема работы пробоотборного устройства в режиме градуировки ГХ (б). Обозначения аналогичны рис. 1а с дополнением: 10.1 – канал подачи градуировочной концентрации ацетона, 10.2 – канал барботирования раствора, 10.3 – сосуд с раствором ацетона

Figure 1. Scheme of operation of the sampling system in the mode of sampling and analysis of exhaled air (a); 1 – gas chromatograph; 2 - valves for switching the flow of exhaled air and calibration sample; 3 – compressor for cleaning of the sample system; 4, 5 - gas connectors in 4 and 3 directions, respectively; 6 - fluoroplastic tubes; 7 – thermostat; 8 - branch pipe; 9 – mouthpiece; 10 - calibration unit; 11 - the volume sensor of exhaled air. Scheme of operation of the sampling system in the mode graduation (b). The designations are the same as in Figure 1a except: 10.1 - channel for the graduation of the acetone concentration, 10.2 - solution bubbling channel, 10.3 - vessel with the acetone solution

ду сериями. Температурные режимы работы ГХ: устройства ввода 110-150 °С, ПКК 30-60 °С, ФИД 100-160 °С.

ПУ и блок градуировки смонтированы на ГХ и вместе с ГХ составляют единый портативный комплекс. Работы ГХ, ПУ и блока градуировки синхронизированы программным обеспечением комплекса. Предусмотрены три режима работы комплекса: градуировка ГХ, отбор и анализ выдыхаемого воздуха, очистка ПУ. Схема работы показана на рис. 1а и 1б в режимах отбора и анализа выдыхаемого воздуха и градуировки, соответственно.

Для стерильности анализов ПУ содержит съёмный одноразовый силиконовый мундштук 9 (рис. 1а), через который пациент выдыхает воздух. Воздух пропускается через патрубок 8 (рис. 1а) объёмом 150 мл, где осаждаются крупные капли влаги из пробы, и заполняет спиральные фторопластовые трубки 6, находящиеся в активном воздушном термостате 7. Температура спиральных трубок 50 °С для предотвращения конденсации на стенках воды, содержащейся в выдыхаемом воздухе. Стрелки на схемах рис. 1а и 1б указывают направления движения потоков газа в системе при анализе выдыхаемого воздуха и при градуировке ГХ (поз. 1 на рис. 1а). Анализ воздуха одного выдоха выполняется многократно путём последовательного отбора автодозировочным вводом ГХ [19] из спиральных трубок малых проб объёмом около 1 мл через трехпортовый газовый коннектор 5 (рис. 1а) при закрытых пневмоэлектродклапанах 2 фирмы Kamozzi (рис. 1а и 1б), установленных на двух выходах четырехпортового газового коннектора 4 (рис. 1а). Очистка ПУ проводится перед каждым анализом откачиванием компрессором 3 (рис. 1а) воздуха в течение 2 минут из открытых спиральных трубок 6 при открытом верхнем и закрытом нижнем пневмоэлектродклапанах 2. Все газовые каналы и соединения ПУ выполнены из инертного фторопласта.

Объем (50 мл) и длина (180 см) спиральных трубок подобраны таким образом, чтобы размывание концентрации анализируемых веществ было незначительным за время анализа трёх малых проб одного выдоха (около 4 минут), отбираемых из центра объёма трубок. Среднее квадратическое отклонение (**СКО**) высоты пика ацетона по трем хроматограммам одного выдоха не превышало 1.5 % в течение 8 часов.

При измерении концентрации ацетона в выдыхаемом воздухе необходимо контролировать фазу выдоха. Фаза определяется по измеренному объёму выдыхаемого воздуха датчиком 11 (рис. 1а). В ПУ предусмотрена возможность использования любой фазы выдоха при медицинских исследованиях. В частности, отбор альвеолярного воздуха, находящегося в равновесии с содержанием ацетона в крови [20], наступает после выдоха пациентом свыше 1800 мл. Фаза отбираемого выдоха контролируется оператором.

Для градуировки измерений ацетона использовали парофазный источник концентрации ацетона, показанный на рис. 1б в виде блока градуировки 10. Блок 10 содержит сосуд (поз. 10.3 на рис. 1б) с градуировочным раствором ацетона. Температура раствора ацетона измеряется автоматически платиновым термосопротивлением ЭПЧ 23 (производства Омского завода «Эталон») с погрешностью ± 0.15 °С. Объёмы раствора и воздуха в сосуде равны 300 и 160 мл, соответственно, с погрешностью не более 2 %. Чистый воздух с выхода газовой линии ГХ 1 (рис. 1б) с расходом 100 см³/мин подается по каналу 10.2 в сосуд 10.3 и барботирует раствор

в сосуде. Клапан управления подачей воздуха в канал 10.2 находится в ГХ. Воздух, насыщенный градуировочной концентрацией паров ацетона, сначала направляется в ПУ через канал 10.1 при открытом нижнем и закрытом верхнем пневмоэлектродклапанах 2 в течение 2 минут для 3-4-х кратного обновления градуировочной концентрацией объёма спиральных трубок 6. Заполнение обеих трубок 6 идёт одновременно путём сбрасывания воздуха через открытые элементы 8, 9 и 11 (рис. 1б). После заполнения спиральных трубок 6 нижний пневмоэлектродклапан 2 закрывают, и проба градуировочной смеси вводится в ГХ автодозировочным устройством ввода ГХ. Электрические линии управления пневмоэлектродклапанами 2 выведены в ГХ. Как следует из схемы ввода градуировочной пробы, она вводится в ГХ по схеме ввода пробы выдыхаемого воздуха, что уменьшает погрешность градуировки.

Для градуировки оператор раз в смену готовит раствор в сосуде 10.3. По команде оператора осуществляются в автоматическом режиме под управлением программного обеспечения: барботирование раствора, заполнение трубок 6 (рис. 1б), анализ градуировочной пробы и градуировка измерений ацетона.

Программное обеспечение газохроматографического комплекса. Для управления комплексом разработано специализированное ПО СОРБАТ-М, устанавливаемое на персональный компьютер (**ПК**), подключённый к хроматографу. Прототипом ПО является программа СОРБАТ [21], созданная для работы с портативными экспрессными поликапиллярными хроматографами серии ЭХО. Обмен информацией с комплексом осуществляется через USB порт с помощью переходника, который создает виртуальный COM порт. Программа работает в операционных системах Windows 7, 8.

Большое число параметров настройки хроматографа и большое количество получаемых хроматограмм определили необходимость четкой и удобной для химика-аналитика систематизации полученной информации. Для этого в программе СОРБАТ создана оригинальная структура хранения и обработки данных на основе терминов Приложение и Набор хроматограмм, заменяющих понятия файл и каталог. Термин Приложение позволяет скрыть файловую систему и оперировать объектами программы, привычными для химика-аналитика: Приложением и Набором хроматограмм. Каждому Приложению соответствуют свои Наборы хроматограмм с градуировкой и настройками хроматографа, измеренными концентрациями веществ и личными данными пациента.

В такой структуре хранения каждая полученная хроматограмма автоматически занимает свое место в Приложении; это удобно тем, что легко контролировать при каких настройках хроматографа получена хроматограмма и какая градуировка ей



Рис. 2. Блок-схема программного обеспечения СОРБАТ-М

Figure 2. Sorbat-M software flowchart

соответствует. При изменении режимов работы ГХ проводится новая градуировка.

Функциональная блок-схема ПО СОРБАТ-М приведена на рис. 2. СОРБАТ-М содержит четыре главных модуля: Приложение, модули управления ГХ и ПУ и Базу данных с Наборами хроматограмм. В главном окне Приложения запускают необходимое Приложение либо создают новое, заданием параметров работы ГХ, через которое запускают остальные модули. Модуль управления ГХ – основной модуль контроля и управления работой прибора, обеспечивает управление отбором и анализом проб выдыхаемого воздуха, градуировкой ГХ и очисткой ПУ.

База данных разбита на Наборы хроматограмм, для каждого из которых первой хроматограммой является градуировочная. По градуировочной хроматограмме проводится идентификация веществ по времени их удерживания и расчет концентраций веществ для всех анализов вплоть до следующей градуировки.

В программе СОРБАТ содержится набор алгоритмов обработки хроматограмм, в частности, автоматический поиск параметров пиков. Эта процедура позволяет находить пики в сложных случаях, когда соседние пики не разделены или небольшие пики расположены на сторонах больших пиков. Для разделения пары слабо разделенных пиков решается обратная задача путём решения системы многопараметрических уравнений методом подбора параметров аппроксимирующих кривых. В процессе подбора минимизируется СКО расчетной кривой от реальной. ПО СОРБАТ-М обеспечивает выполнение следующих функций:

- создание и хранение Приложений с установленными режимами работы ГХ: температурами колонки, детектора, устройства ввода пробы в колонку, времени отбора, анализа пробы и т.п.;
- обработку хроматограмм, включая идентификацию веществ, градуировку, расчёт концентрации веществ;

- автоматизацию в целом анализа выдыхаемого воздуха с градуировкой;
- формирование базы данных пациентов;
- уведомление оператора об ошибках в работе ГХ.

Структура ПО построена таким образом, чтобы помочь оператору в выполнении отдельных этапов при проведении градуировки и анализа. По мере проведения отдельных этапов на экране ПК появляются краткие инструкции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Градуировка измерений ацетона. На определение концентрации веществ в выдыхаемом воздухе влияет ряд факторов: смена режимов пробоотбора, газохроматографического разделения, текущие загрязнения оптического окна ионизационной камеры фото-ионизационного детектора. Поэтому необходима периодическая градуировка газохроматографического комплекса с использованием градуировочных проб ацетона. Для этой цели используют различные источники градуировочных образцов, в том числе хроматомембранное генерирование стандартных смесей [22], динамические методы формирования газовых смесей хромато-десорбционными методами [23], методы формирования микропотока с использованием полимерных ампул [24], парофазные источники газовых смесей [25, 26]. Методы приготовления градуировочных смесей [22 - 24] громоздки для встраивания в портативный прибор, а имеющиеся решения парогазовых источников снижают во времени заданный уровень концентрации. Поэтому был разработан оригинальный встроенный в ГХ парофазный источник концентрации паров ацетона.

Характерная концентрация ацетона в выдыхаемом человеком воздухе находится в интервале $(10^{-9} - 10^{-10})$ г/см³. Учитывая это, для градуировки готовили пар ацетона с концентрацией порядка 10^{-10} г/см³, равновесный с раствором ацетона в дистиллированной воде или в медицинском физрастворе. Для получения концентраций равновесного пара такого порядка применяли водный раствор ацетона с концентрацией $\sim 10^{-7}$ г/см³ и использовали коэффициент Генри K [27], экспериментально определённый с относительной погрешностью 6.7 % в [28] для такого уровня концентраций водных растворов ацетона. Учитывали также температурную зависимость K , приведённую в таблице.

Расчет градуировочной концентрации C_G осуществляли по формуле:

$$C_G = \frac{m}{KV_L + V_G}, \quad (1)$$

где m – масса ацетона в водном растворе, V_L и V_G – объёмы жидкой и газовой фаз в сосуде 10.3 (рис. 1б), соответственно, K – коэффициент Генри при соответствующей температуре из табл. 1. По градуи-

Таблица

Коэффициенты Генри К равновесного пара для ацетона в дистиллированной воде и физиологическом растворе [28]

Table

Henry's coefficients K of equilibrium acetone vapor in distilled water and physiological solution [28]

Коэффициенты Генри	Температура, °C							
	17	20	23	25	27	30	35	40
K в дист. воде	720	606	478	451	387	350	284	208
K в физрастворе		606		462		320	278	224

ровочной концентрации C_G определяли концентрацию ацетона C_A в выдыхаемом воздухе:

$$C_A = \frac{C_G S_A}{S_G} \quad (2)$$

где S_A и S_G - площади хроматографических пиков ацетона в выдыхаемом воздухе и в градуировочной пробе, соответственно.

Для получения градуировочной концентрации паров ацетона, например, $C_G = 2.9 \cdot 10^{-10}$ г/см³ готовили водный раствор с концентрацией ацетона $C_{L0} = 1.33 \cdot 10^{-7}$ г/см³. Для этого в 300 мл растворителя в сосуде блока градуировки добавляли 1 мкл пятипроцентного водного раствора ацетона (при этом масса m ацетона в сосуде блока градуировки равна (39 ± 1) мкг) и тщательно перемешивали. Равновесие концентраций в растворителе и в воздухе сосуда 10.3 (рис. 16) при температуре 25 °C наступает через 20 минут [28]. Рекомендуемое отклонение температуры раствора в процессе градуировки не более ± 0.5 °C от температуры в момент внесения градуировочной смеси. Для градуировочных смесей использовали ацетон с чистотой 99.75 % (ГОСТ 2603-79). Приготовление 5-ти процентного раствора и его дозирование с погрешностью 1 % осуществляли хроматографическими шприцами Hamilton 1 мкл и 10 мкл.

В качестве растворителя для создания градуировочной концентрации ацетона использовали дистиллированную воду или физиологический раствор. Градуировочная концентрация сохраняется с погрешностью не более 5 % в течение 8-ми часового рабочего дня [28].

Относительную погрешность σ_A определения концентрации ацетона C_A в выдыхаемом воздухе рассчитывали, предполагая независимость погрешностей измерения всех параметров, по формуле:

$$\sigma_A = \sqrt{\sigma_K^2 + 2\sigma_V^2 + 2\sigma_S^2 + \sigma_m^2}$$

где среднеквадратичные относительные погрешности определения: коэффициента Генри $\sigma_K = 6.7$ % [28], объемов раствора ацетона и воздуха в блоке градуировки $\sigma_V = 1$ %, площади хроматографического пика ацетона $\sigma_S = 5$ % в выдыхаемом воздухе и градуировочной пробе, массы ацетона в градуировочном растворе $\sigma_m = 2.5$ %. Относительная погрешность определения концентрации ацетона в выдыхаемом воздухе не превышала 10 %.

Градуировку проводили каждый раз при включении комплекса ГХ с ПУ или изменении параметров ГХ (температуры ПКК, времени дозирования пробы в ГХ и других).

Методика анализа выдыхаемого воздуха, содержащая этапы градуировки ГХ и анализа воздуха, показана на рис. 3. В верхней части рис. 3 отображены этапы градуировки, в нижней – этапы анализа выдыхаемого воздуха. При включении в ПО процедуры «Градуировка» автоматически проводится очистка ПУ и измеряется фон над чистой водой (этап «фон над водой»). Далее оператор добавляет в воду необходимое количество пятипроцентного раствора ацетона (этап «подготовка раствора»). Остальные этапы: барботирование, отбор и анализ градуировочной газовой смеси, определение времени удерживания и площади хроматографического пика ацетона (этап «параметры градуировки») выполняются в автоматическом режиме. Регистрируемая градуировочная хроматограмма помещается в программном обеспечении в начало нового Набора хроматограмм и используется в автоматическом расчете концентраций по формуле (1) для всех анализов в данном Наборе.

При включении в ПО процедуры «Анализ» автоматически осуществляется очистка ПУ. Далее оператор, следуя инструкциям в окне программы, записывает данные о пациенте, проводит отбор

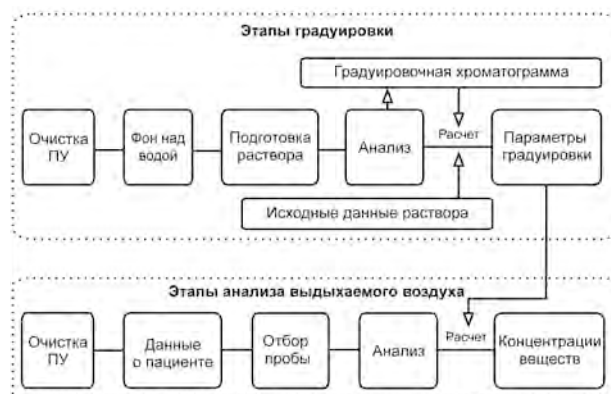


Рис. 3. Последовательность автоматизации анализа выдыхаемого воздуха и градуировки, реализуемая в программном обеспечении SORBAT-M

Figure 3. Automation sequence of the exhaled air analysis and calibration implemented in the SORBAT-M software

пробы выдыхаемого воздуха, по окончании которого автоматически выполняется трёхразовый анализ одного выдоха (этап «Анализ»), определение средних значений времени удерживания и площади хроматографического пика ацетона в выдыхаемом воздухе, расчет концентрации вещества по формуле (2).

Примеры анализа выдыхаемого воздуха.

Для демонстрации возможностей разработанного экспрессного метода анализа выдыхаемого воздуха с автоматизированной градуировкой обследовали по рекомендации авторов работы [29] здоровых студентов, имеющих и не имеющих больных родственников сахарным диабетом. Отбор проб выдыхаемого воздуха проводили утром натощак в условиях лекционной аудитории и в соответствии с общепринятыми требованиями локально-этического кабинета. Отбирали альвеолярные порции выдыхаемого воздуха. Параметры хроматографического анализа: температура ПКТ 35 °С, скорость потока газа-носителя 25 см³/мин.

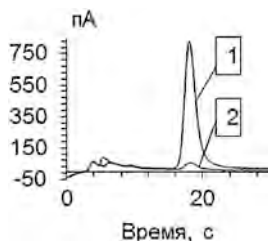


Рис. 4. Хроматограммы выдыхаемого воздуха двух студентов (19 лет): 1 – для студента, у которого отец болен сахарным диабетом; 2 – для студента без родственников с сахарным диабетом

Figure 4. Chromatograms of exhaled breath samples by two students: 1 – student's father has diabetes mellitus; 2 – student has no relatives with diabetes mellitus

На рис. 4 представлены хроматограммы выдыхаемого воздуха двух здоровых студентов. У первого студента один из родителей болен сахарным диабетом, у другого студента нет родственников с сахарным диабетом. Пик 1 на рис. 4 соответствует концентрации ацетона 19.3 мг/м³, пик 2 – концентрации 1.1 мг/м³.

На рис. 5 показаны хроматограммы выдыхаемого воздуха трех студентов 19 лет: у одного студента дедушка болен сахарным диабетом (пик 1), у другого студента отец и бабушка больны сахарным диабетом (пик 2) и третий студент без родственников с сахарным диабетом (пик 3). Пикам 1-3 на рис. 5 соответствуют концентрации ацетона 11.3, 4.4 и 1.7 мг/м³ соответственно.

Из рис. 4 и рис. 5 следует, что у студентов с родственниками, больными сахарным диабетом, концентрации ацетона выше, чем у студента без родственников с сахарным диабетом.

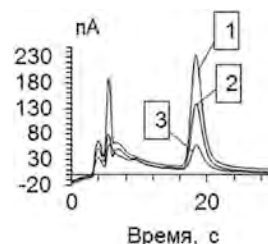


Рис. 5. Хроматограммы выдыхаемого воздуха трех студентов 19 лет: 1 – для студента, у которого дедушка болен сахарным диабетом; 2 – для студента, у которого отец и мать отца больны сахарным диабетом; 3 – для студента без родственников с сахарным диабетом

Figure 5. Chromatograms of exhaled breath samples by three students: 1 – student's grandfather has diabetes mellitus; 2 – student's mother and grandmother have diabetes mellitus; 3 – students have no relatives with diabetes mellitus

Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанная методика анализа выдыхаемого воздуха с пороговой чувствительностью по ацетону 1 ppb может быть использована для исследовательских целей в области дифференцирования пациентов по нарушениям метаболизма. Портативность реализации методики, короткое время удерживания ацетона в районе 20 с определяют возможность создания методик обследования пациентов в режиме реального времени во внелабораторных условиях.

Благодарности

Авторы благодарят д.м.н., профессора В.Ю. Куликова за постановку задачи по анализу выдыхаемого воздуха и организацию обследования студентов.

Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных научных исследований СО РАН IX.138.1 в рамках научного проекта IX.138.1.1 и Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках гранта 12034 ГУ/2017.

Acknowledgements

The authors thank Professor V. Yu. Kulikov for the statement of the problem on the analysis of exhaled air and the organization of the students' examinations.

The work was supported by the Program of Fundamental Scientific Researches of SB RAS IX.138.1, scientific project IX.138.1.1, and the Fund of Assistance to Development of Small Forms of Enterprises in Scientific-Technical sphere in the framework of the grant 12034 GU/2017.

ЛИТЕРАТУРА

1. Analysis of exhaled breath for screening of lung cancer patients / A. Amann [et al.] // MEMO. 2010. V. 3. P. 106-112.

2. Preliminary study of volatile organic compounds from breath and stomach tissue by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry / T. Ligor [et. al.] // *J. Breath Res.* 2007. V. 1, № 1. P. 016001.
3. Хромато-десорбционные микросистемы для количественного определения биомаркеров сердечно-сосудистых заболеваний в выдыхаемом воздухе / И.А. Платонов [и др.] // *Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения.* 2017. №1. С. 14-16.
4. Диагностическая значимость среднелетучих органических соединений в конденсате выдыхаемого воздуха при бронхиальной астме и хронической обструктивной болезни легких / Т.Н. Анохина [и др.] // *Пульмонология.* 2011. № 4. С. 71-75.
5. Хромато-масс-спектрометрическое определение среднелетучих органических веществ в конденсате выдыхаемого воздуха / А.А. Родионов [и др.] // *Масс-спектрометрия.* Т. 4, № 2. С. 143-148.
6. Степанов Е.В. Методы высокочувствительного газового анализа молекул-биомаркеров в исследованиях выдыхаемого воздуха // *Труды института общей физики им. А.М. Прохорова.* 2005. Т. 61. С. 1-47.
7. Перспективы диагностики различных заболеваний по составу выдыхаемого воздуха / Ф.Ю. Копылов [и др.] // *Клиническая медицина.* 2013. № 10. С. 16-21.
8. Kharitonov S.A. Barnes P.J. Exhaled breathe analysis // *New Drugs for Asthma, Allergy and COPD. Prog Respir Res.* Basel, Karger. 2001. V. 31. P. 44-47.
9. Breath acetone - aspects of normal physiology related to age and gender as determined in a PTR-MS study / K. Schwarz [et al.] // *J. of breath research.* 2009. V. 3, № 2. P. 027003.
10. Содержание ацетона в выдыхаемом воздухе и особенности метаболических нарушений у больных сахарным диабетом / В.Ю. Куликов [и др.] // *Сетевое научное издание «Медицина и образование в Сибири».* 2010. № 6.
11. Breath acetone concentration: biological variability and the influence of diet / P. Spanel [et.al] // *Physiological Measurement.* 2011. V. 32, № 8. P. 23-31.
12. The Ketonix Manual v2.5 [Электронный ресурс]: <http://www.ketonix.com/images/PDF/Ketonix-Manual-Current.pdf> (дата обращения 25.04.2018).
13. Nanosensor Device for Breath Acetone Detection / L. Wang [et al.] // *Sensor Lett.* 2010. V. 8. P. 1-4.
14. Breath acetone monitoring by portable Si:WO₃ gas sensors / M. Righettoni [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* 2012. V. 738. P. 69-75.
15. Continuous Monitoring of Breath Acetone, Blood Glucose and Blood Ketone in 20 Type 1 Diabetic Outpatients Over 30 Days / S. Meixiu [et al.] // *J Anal. Bioanal. Tech.* 2017. V. 8, № 5. P. 386- 93.
16. The sensing mechanism and detection of low concentration acetone using chitosan-based sensors / T. Nasution [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical.* 2013. V. 177. P. 522-528.
17. Портативные экспрессные газоаналитические приборы для определения следовых количеств веществ / В.М. Грузнов [и др.] // *Российский химический журнал.* 2002. Т. 46, № 4. С. 100-108.
18. Патент на полезную модель 178679 РФ. Пробоотборник для анализа выдыхаемого воздуха / Балдин М.Н., Грузнов В.М., Малышева А.О. (РФ). № 2017136748/28/28; заявл. 18.10.2017; опублик. 17.04.2018, Бюл. № 11. 2 с.
19. Патент 2399044 РФ, МПК G01N 30/16. Устройство ввода пробы в газовый хроматограф / Балдин М.Н., Грузнов В.М., Симаков В.А. (РФ). № 2009132432/28; заявл. 27.08.2009; опублик. 10.09.2010, Бюл. № 25. 11 с.
20. Баринская Т.О., Смирнов А.В. Определение этанола в выдыхаемом воздухе // *Проблемы аналитической химии.* Т. 13. Внелабораторный химический анализ / под ред. Ю.А. Золотова. Москва: Наука. 2010. С. 342-363.
21. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2010615767 Сорбат / Блинова Л.В. РФ заявл. 5.07.2010; опублик. 6.09.2010.
22. Горбачева А.Р., Родинков О.В., Хроматомембранное генерирование стандартных газовых смесей летучих органических соединений на уровне ppm // *Аналитика и контроль.* 2018. Т. 22, № 1. С. 75-82.
23. Получение газовых смесей известного состава динамическими методами / П.И.А. Платонов [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2017. Т. 17, № 3. С. 378-387.
24. Каталог эталонных материалов ВНИИМ 06. Газы и газовые смеси [Электронный ресурс]: <http://catalog.vniim.ru/files/raz06-06.pdf> (дата обращения 09.01.2018 г.)
25. Витенберг А. Г., Конопелько Л. А. Парофазный газохроматографический анализ: метрологические приложения // *Журн. аналит. химии.* 2011. Т. 66, № 5. С. 452-472.
26. Витенберг А. Г., Пичугина А.С., Добряков Ю.Г. Использование парофазных источников газовых смесей для градуировки и поверки аналитической аппаратуры при измерении содержания примесей летучих веществ. // *Измерительная техника.* 2009. № 12. С. 58-63.
27. Витенберг А.Г., Иоффе Б.Ф. Газовая экстракция в хроматографическом анализе: парофазный анализ и родственные методы. Л.: Химия. 1982. 280 с.
28. Малышева А.О. Балдин М.Н. Грузнов В.М. Определение коэффициентов распределения летучих органических веществ в системе жидкость-воздух для создания градуировочных газообразных образцов со следовыми концентрациями веществ // *Журн. аналит. химии.* 2017. Т. 72, № 10. С. 3-7.
29. Оценка легких углеводородов в выдыхаемом воздухе у студентов университета как предиктора метаболических нарушений / В.Ю. Куликов [и др.] // *Сетевое научное издание «Медицина и образование в Сибири»*, 2010. № 3.

REFERENCES

1. Amann A., Ligor M., Ligor T., Bajtarevic A., Ager C., Pienz M., Denz H., Fiegl M., Hilbe W., Weiss W., Lukas P., Jamnig H., Hackl M., Haidenberger A., Sponring A., Filipiak W., Miekisch W., Schubert J., Troppmair J., Buszewski B. Analysis of exhaled breath for screening of lung cancer patients, *MEMO*, 2010, vol. 3, pp. 106-112. doi: 10.1007/s12254-010-0219-2
2. Ligor T., Szeliga J., Jackowski M., Buszewski B. Preliminary study of volatile organic compounds from breath and stomach tissue by means of solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Breath Res.* 2007, vol. 1, no. 1, p. 016001, doi:10.1088/1752-7155/1/1/016001
3. Platonov I.A., Kolesnichenko I.N., Lobanova M.S., Mikheenkova A.E. [Chromato-desorption microsystems for the quantitative determination of cardiovascular diseases biomarkers in breath]. *Sovremennaya nauka: actual'nye problemy i puti ikh resheniya* [Modern science: actual problems and ways of their solutions], 2017, no. 1, pp. 14-16 (in Russian).
4. Anokhina T.N., Anaev E.Kh., Revelski A.I., Rodionov A.A., Alekseev D.V., Revelski I.A., Kudriavtsev V.B. Diagnostic value of semi-volatile organic compounds in exhaled breath condensate of asthma and chronic obstructive pulmonary disease patients. *Pulmonology*, 2011, no. 4, pp. 71-75, doi:10.18093/0869-0189-2011-0-4-71-75

5. Rodionov A.A., Revelsky A.I., Revelsky I.A., Anohina T.N., Anaev E.H. Determination of semi-volatile organic compounds in exhaled breath condensate. *J. Anal. Chem.*, 2014, vol. 69, no. 14, pp. 1330-1336. doi:10.1134/S1061934814140081
6. Stepanov E.V. [Methods of highly sensitive gas analysis of biomarker molecules in exhaled air studies]. *Trudy instituta obshchei fiziki im A.M. Prokhorova* [Writings of General Physics Institute named after A.M. Prokhorov], 2005, vol. 61, pp. 1-47 (in Russian)
7. Kopylov F.Iu., Syrkin A.L., Chomakhidze P.Sh., Bykova A.A., Shaltaeva Iu.R., Beliakov V.V., Pershenkov V.S., Samotoev N.N., Golovin A.B., Vasil'ev V.K., Malkin E.K., Gromov V.V., Ivanov I.A., Lipatov D.Iu., Iakovlev D.Iu. [Prospects for the diagnosis of various diseases in the composition of exhaled air]. *Klinicheskaya meditsyna* [Clinical Medicine], 2013, no. 10, pp. 16-21 (in Russian)
8. Kharitonov S.A., Barnes P.J. Exhaled breathe analysis, New Drugs for Asthma, Allergy and COPD. *Prog Respir Res. Basel, Karger* 2001, vol. 31, pp. 44-47, doi: 10.1159/000062127
9. Schwarz K., Pizzini A., Arendacká B., Zerlauth K., Filipiak W., Schmid A., Dzien A., Neuner S., Lechleitner M., Scholl-Bürgi S., Miekisch W., Schubert J., Unterkofler K., Witkovský V., Gastl G., Amann A. Breath acetone - aspects of normal physiology related to age and gender as determined in a PTR-MS study. *J. of breath research*, 2009. vol. 3, no. 2, p. 027003. doi: 10.1088/1752-7155/3/2/027003.
10. Kulikov V.Iu., Ruiatkina L.A., Sorokin M.Iu., Shabanova E.S., Baldin M.N., Gruznov V.M., Petrovskii D.P., Efimenko A.P., Schneider E.P., Moshkin M.P. [The content of acetone in the exhaled air and the peculiarities of metabolic disorders in patients with diabetes mellitus]. *Setevoe nauchnoe izdanie "Meditsina i obrazovanie v Sibiri"* [Network scientific publication "Medicine and Education in Siberia."], 2010, no. 6. (in Russian)
11. Španěl P., Dryahina K., Rejšková A., Chippendale T.W.E., Smith D. Breath acetone concentration: biological variability and the influence of diet. *Physiological Measurement*, 2011, vol. 32, no. 8, pp. 23-31. doi: 10.1088/0967-3334/32/8/N01.
12. The Ketonix Manual v2.5 Available at: <http://www.ke-tonix.com/images/PDF/Ketonix-Manual-Current.pdf> (accessed 25 April 2018).
13. Wang L., Kalyanasundaram K., Stanacevic M. and Gouma P. Nanosensor Device for Breath Acetone Detection. *Sensor Lett.*, 2010, vol. 8, pp. 1-4. doi:10.1166/sl.2010.1334
14. Righettoni M., Tricoli A., Gass S., Schmid A., Amann A., Pratsinis SE. Breath acetone monitoring by portable Si:WO₃ gas sensors. *Anal. Chim. Acta*, 2012, vol. 738, pp. 69-75. doi: 10.1016/j.aca.2012.06.002.
15. Meixiu Sun, Zhennan Wang, Yuan Yuan, Zhuying Chen, Xiaomeng Zhao, Yingxin Li and Chuji Wang. Continuous Monitoring of Breath Acetone, Blood Glucose and Blood Ketone in 20 Type 1 Diabetic Outpatients Over 30 Days. *J. Anal. Bioanal. Tech.*, 2017, vol. 8, no. 5, pp. 386-393. doi: 10.4172/2155-9872.1000386.
16. Nasution T., Nainggola I., Hutagalung S.D., Ahmad K.R., Ahmad Z.A. The sensing mechanism and detection of low concentration acetone using chitosan-based sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2013, vol. 177, pp. 522-528. doi: 10.1016/j.snb.2012.11.063
17. Gruznov V.M., Filonenko V.G., Baldin M.N., Shishmarev A.T. Portable express gas analyzers for determination of trace amounts of substances *Rossiiskii khimicheskii zhurnal* [Journal of Russian Chemistry], 2002, vol. 46, no. 4, pp. 100-108 (in Russian)
18. Baldin M.N., Gruznov V.M., Malysheva A.O. *Probootbornik dlia analiza vydykhaemogo vozdukh* [Sample device for analysis of exhaled air]. Utility model patent RF no. 178679, 2018 (in Russian)
19. Baldin M.N., Gruznov V.M., Simakov V.A. *Ustroistvo vvoda proby v gazovyi khromatograf* [Insertion sample device for gas chromatograph]. Patent RF no. 2399044, 2010 (in Russian)
20. Barinskaia T.O., Smirnov A.V. [Detection of ethanol in the exhaled air]. *Problemy analiticheskoi khimii* [Problems of analytical chemistry], vol. 13: *Nonlaboratory chemical analysis*, Moskva: Nauka Publ, 2010, pp. 342-363. (in Russian)
21. Blinova L.V., e.a. *Programma dlia EVM Sorbat* [Software Sorbat]. Patent RF №2010615767 (in Russian)
22. Gorbacheva A.R., Rodinkov O.V., [Chromatomembrane generation of standard gas mixtures of volatile organic compounds in ppm level]. *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2018, vol. 22, no. 1, pp. 75-82. doi: 10.15826/analitika.2018.22.1.002.
23. Platonov I.A., Kolesnichenko I. N., Lobanova M. S., Mikheenkova A. E. [Gas mixtures of the known composition by dynamic methods]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy* [Sorption and Chromatographic Processes]. 2017, vol. 17, no. 3, pp. 378-387. doi: 10.17308/sorpchrom.2017.17/391
24. *Catalog of standard materials VNIIM 06. Gases and gas mixture*. Available at: <http://catalog.vniim.ru/files/raz06-06.pdf> (accessed 09 January 2018 r.)
25. Vitenberg A.G., Konopelko L.A., Gas-chromatographic headspace analysis: metrological aspects. *J. Anal. Chem.*, 2011, vol. 66, no. 5, pp. 438 - 457, doi: 10.1134/S106193481103018X
26. Vitenberg A.G., Pichugina A.S., Dobryakov Y.G. Use of vapor-phase sources of gas mixtures for calibration and verification of analytical: equipment in measuring the content of volatile substance impurity content, *Measurement techniques*, 2009, no. 12, pp. 1372 – 1379, doi: 10.1007/s11018-010-9447-4
27. Vitenberg A.G., Ioffe B.F. *Gasovaia ekstraktsiia v khromatograficheskom analize: parofaznyi analiz i rodstvennye metody* [Gas extraction in chromatographic analyses: headspace analysis and related methods]. Leningrad, Khimiia Publ., 1982, 280 p. (in Russian)
28. Malysheva A.O., Baldin M.N., Gruznov V.M. Determination partition coefficients of volatile organic substances in the system liquid-air for the creation of calibration gas-phase samples with trace concentrations of substances, *J. of Anal. Chem.* 2017. vol. 72, no. 10, pp. 1013-1017. doi: 10.1134/S1061934817100112
29. Kulikov V.Iu., Ruiatkina L.A., Sorokin M.Iu., Shabanova E.S., Baldin M.N., Gruznov V.M., Petrovskii D.P., Schneider E.P., Moshkin M.P. [Assessment of light hydrocarbons in exhaled air in university students as a predictor of metabolic disorders], *Setevoe nauchnoe izdanie "Meditsina i obrazovanie v Sibiri"* [Network scientific publication "Medicine and Education in Siberia."], 2010, no. 3 (in Russian)